

Inactivación viral en el Intacglobín por el pH y la temperatura

Armando Cádiz¹, María Esther Castellano², Dalia Rodríguez³, Rosa Iris Reina², Janhna Hernández¹, Alexandro Rodríguez⁴, Aniel Moya¹.

¹ Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: acadiz@finlay.edu.cu

² Planta de Hemoderivados. Ciudad de La Habana, Cuba.

³ Instituto Nacional de Medicina Veterinaria. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁴ Dpto. Inmunología ICBP Victoria de Girón. Ciudad de La Habana, Cuba

Se utilizó la Encefalomiocarditis (EMC) porcina como virus modelo en el estudio de inactivación viral en el proceso de producción de un preparado de inmunoglobulina humana para uso intravenoso, para lo que se escogieron dos variables a tener en cuenta: el pH y la temperatura; preparándose cuatro grupos experimentales: pH ácido (4,3) y temperatura 5 °C, pH ácido (4,3) y temperatura 28 °C, pH básico (7,0) y temperatura 5 °C y por último pH básico (7,0) y temperatura 28 °C. Para cada caso se tomaron muestras a diferentes tiempos para conocer el grado de inactivación viral. Los mejores resultados en cuanto a la disminución de la infectividad, se obtuvieron para las muestras tratadas con pH 4,3 y temperatura 28 °C, mostrándose la total inactivación del virus, a partir de las 8 h. En las muestras tratadas bajo las otras condiciones, solo se observó la completa inactivación viral a partir de las cinco semanas. Verificamos que las características organolépticas y químicas del producto se mantuvieron inalterables durante el transcurso de las ocho semanas que duró el experimento. Llegamos a conclusiones acerca de que el pH ácido y las altas temperaturas, así como el tiempo de incubación, son variables importantes en la cinética de inactivación viral.

Palabras claves: Inmunoglobulina intravenosa, inactivación viral, pH y temperatura.

Introducción

La transmisión de enfermedades virales de alto riesgo por el uso de productos biofarmacéuticos es hoy en día, con el surgimiento y expansión de nuevas entidades virales, más que una preocupación teórica para productores y agencias reguladoras (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

En la última década se han presentado reportes de contagio viral a partir de inmunoglobulinas de uso intravenoso. La importancia de estos productos biológicos en el campo de la hemoterapia hace necesario el poder alcanzar una total seguridad en este sentido, lo que requerirá de un conocimiento más exacto de la naturaleza, prevalencia y posibles niveles en sangre de estos virus, así como de la implementación de estrategias para reducir, eliminar o inactivar esta infectividad viral.

Para que un proceso de elaboración quede debidamente validado, será necesario infectar el sistema y comprobar su eficiencia para la reducción de títulos infectivos. Obviamente, es inapropiado introducir cualquier virus ajeno en un proceso de producción, por lo que la validación debe desarrollarse en un laboratorio separado y equipado para el trabajo de virología.

Entre los virus más usados en estudios de validación podemos mencionar al virus de la Polio, Citomegalovirus y VIH entre otros (8, 9, 10, 11). En todos los casos es

necesario calcular el factor de reducción de cada uno de los virus incluidos en la validación, tanto para los diferentes pasos particulares como para el proceso en general.

En este trabajo utilizaremos como modelo el virus de la Encefalomiocarditis (EMC) porcina, con el objetivo de conocer la capacidad de inactivación/remoción de este, como modelo viral, en el proceso de producción de una inmunoglobulina humana de uso intravenoso (Intacglobín), además de demostrar de forma práctica que el pH ácido y la temperatura desempeñan un papel importante en la inactivación viral.

Materiales y Métodos

Para los estudios de inactivación viral partimos de una cepa del virus de Encefalomiocarditis (EMC) porcina, obtenida en el Laboratorio Central de Diagnósticos Veterinarios, la cual fue mantenida en una línea celular originada a partir de fibroblastos de curiel (LFBC).

La actividad biológica del virus fue titulada por el método del punto final en cultivo hecho con RPMI 1640 de los Laboratorios GIBCO BRL de New York, conteniendo 25 MM HEPES, L-glutamine y sin NaHCO₃, en microplacas de 96 pocillos incubadas más de 72 h a 37 °C en

atmósfera de 5% de CO₂ y por inoculación en ratones de 6 a 8 g.

En ambas titulaciones la LD₅₀ fue calculada por el método de Reed y Muench de 1938 (12).

Grupo A, incubadas con pH ácido:

- A1: pH 4.3 y temperatura 28 °C.
- A2: pH 4.3 y temperatura 28 °C.
- A3: (cn), pH 4.3 y temperatura 28 °C.
- A4: (cq), pH 4.3 y temperatura 28 °C.
- A5: pH 4.3 y temperatura 5 °C.
- A6: pH 4.3 y temperatura 5 °C.
- A7: (cn), pH 4.3 y temperatura 5 °C.
- A8: (cq), pH 4.3 y temperatura 5 °C.

A cada frasco fue añadida una parte de virus por cada 9 partes de Intacglobín, teniendo para cada variante un control negativo (cn) y un control químico (cq).

Las muestras se mantuvieron en baño de hielo y homogenización por 10 min para su total dilución y fueron incubadas según se describe en las tablas.

El virus fue añadido a pH neutro para garantizar su integridad y la medida inicial, posteriormente y en el caso de las muestras que se incubarían en ambiente ácido, se disminuyó el pH hasta 4.3 con solución de HCl 1N, tomándose, a partir de este momento, alícuotas a diferentes intervalos de tiempo, las que fueron neutralizadas con hidróxido de sodio 1 N hasta pH 7,2 para mantener la infectividad del virus y guardadas a -40 °C, hasta su titulación.

La recuperación viral se realizó utilizando como línea celular la descrita anteriormente y las diluciones seriadas de las muestras fueron hechas en medio RPMI, que contienen 10% de suero de ternero neonato e incubadas por duplicado en placas de 96 pocillos conteniendo la monocapa de la línea celular a razón de 200 microlitros por pocillo. Las placas fueron incubadas en atmósfera de 5% de CO₂ y cada pocillo fue examinado para observar el efecto citopático, considerándose punto final de cada dilución el último pocillo donde se observó un foco o más de este efecto.

En cada ensayo se montaron células no infectadas, material no contaminado y título del virus usado, como controles negativos y positivos respectivamente.

A partir del lote 01103 de Intacglobín, producido en la Planta de Hemoderivados de Ciudad de La Habana, preparamos cuatro grupos de muestras, con un duplicado para cada variante, como se indica a continuación:

Grupo B, incubadas con pH básico:

- B1: pH 7.0 y temperatura 28 °C.
- B2: pH 7.0 y temperatura 28 °C.
- B3: (cn), pH 7.0 y temperatura 28 °C.
- B4: (cq), pH 7.0 y temperatura 28 °C.
- B5: pH 7.0 y temperatura 5 °C.
- B6: pH 7.0 y temperatura 5 °C.
- B7: (cn), pH 7.0 y temperatura 5 °C.
- B8: (cq), pH 7.0 y temperatura 5 °C.

Todas las muestras donde no fue detectado título viral en las diluciones seriadas, fueron incubadas en tubos que contenían monocapa de línea celular LFBC a fin de realizar aislamiento.

Los factores de reducción (FR) se calcularon por la fórmula (13):

$$FR = \frac{V1 \times T1}{V2 \times T2}$$

donde:

- V1: Volumen del material inicial
- T1: Concentración viral en el material inicial
- V2: Volumen del material final
- T2: Concentración viral en el material final

El factor de reducción total de un proceso de producción es considerado como la suma de los factores de reducción de cada etapa individual (14).

Resultados

Las Tablas 3, 4, 5 y 6, y las Figuras 1, 2, 3 y 4, muestran los resultados en cuanto a la disminución de la infectividad viral en las muestras de Intacglobín, incubadas en las cuatro condiciones descritas, observándose que la combinación del pH ácido (4,3) y las altas temperaturas (28 °C), es capaz de inactivar todo el virus presente en solo 8 h de incubación, siendo esto posible para las tres condiciones de incubación restantes, solo a partir de las cinco semanas.

Tabla 3. Inactivación del virus de la EMC porcina en el Intacglobín a pH ácido e incubación a 28°C

Período de incubación a 28°C	Título del virus de la EMC porcina (log 10).	
	1ra réplica	2da réplica
0 horas	6.0	6.0
2 horas	4.0	4.0
4 horas	4.0	4.0
6 horas	4.0	4.0
8 horas	0	0
24 horas	0	0
48 horas	0	0
72 horas	0	0
1 semana	0	0
2 semanas	0	0
3 semanas	0	0
4 semanas	0	0
5 semanas	0	0
6 semanas	0	0
Factor de Reducción:		
A las 8 horas	6.0	6.0
A las 4 semanas	6.0	6.0

Tabla 4. Inactivación del virus de la EMC porcina en el Intacglobín a pH básico e incubación a 28 °C

Período de incubación a 28 °C	Título del virus de la EMC porcina (log 10)	
	1ra réplica	2da réplica
0 horas	6.0	6.0
2 horas	6.0	6.0
4 horas	6.0	6.0
6 horas	6.0	6.0
8 horas	3.0	6.0
24 horas	4.0	4.0
48 horas	1.0	3.0
72 horas	2.0	3.0
1 semana	1.0	3.0
2 semanas	2.0	2.0
3 semanas	1.0	1.0
4 semanas	2.0	0
5 semanas	0	0
6 semanas	0	0
Factor de Reducción:		
A las 8 horas	3.0	0
A Las 4 semanas	0	

Gráfico 1. Influencia del pH en la inactivación viral a altas temperaturas

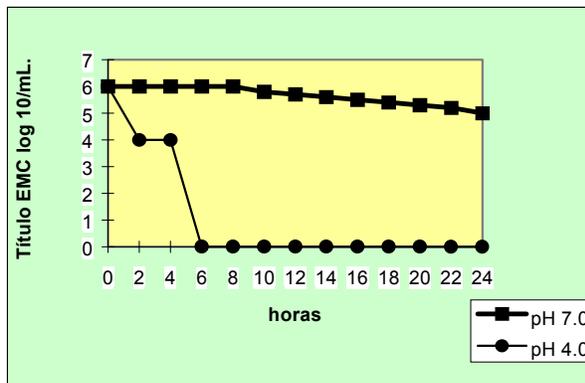


Tabla 5. Inactivación del virus de la EMC porcina en el Intacglobín a pH 4.0 e incubación a 5 °C

Período de incubación a 5 °C	Título del virus de la EMC porcina (log 10)	
	1ra réplica	2da réplica
0 horas	6.0	6.0
2 horas	6.0	6.0
4 horas	6.0	6.0
6 horas	3.0	3.0
8 horas	4.0	4.0
24 horas	4.0	4.0
48 horas	3.0	3.0
72 horas	3.0	3.0
1 semana	3.0	2.0
2 semanas	3.0	3.0
3 semanas	3.0	2.0
4 semanas	1.0	2.0
5 semanas	0	0
6 semanas	0	0
Factor de Reducción:		
A las 8 horas.	2.0	2.0
A Las 4 semanas	5.0	4.0

El producto no causó efecto tóxico en el tejido y el título del virus se mantuvo durante todos los ensayos. Los

resultados químicos después de ocho semanas de incubación a 28 °C fueron satisfactorios.

Tabla 6. Inactivación del virus de la EMC porcina en el Intacglobín a pH 7.0 e incubación a 5 °C

Período de incubación a 5°C.	Título del virus de la EMC porcina (log 10)	
	1ra réplica	2da réplica
0 horas	6.0	6.0
2 horas	6.0	6.0
4 horas	4.0	6.0
6 horas	3.0	2.0
8 horas	4.0	4.0
24 horas	4.0	3.0
48 horas	3.0	2.0
72 horas	2.0	1.0
1 semana	3.0	3.0
2 semanas	1.0	2.0
3 semanas	3.0	2.0
4 semanas	2.0	3.0
5 semanas	0	0
6 semanas	0	0
Factor de Reducción:		
A las 8 horas.	2.0	2.0
A Las 4 semanas.	4.0	3.0

Gráfico 2. Influencia del pH en la inactivación viral a bajas temperaturas

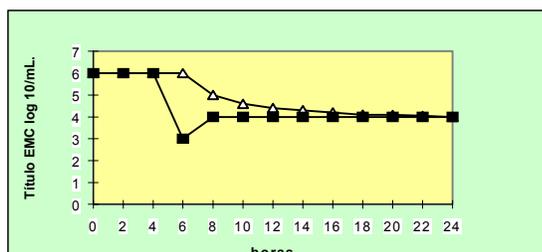
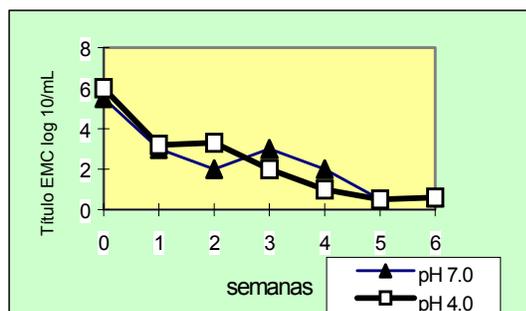


Gráfico 3. Influencia del pH en la inactivación viral a bajas temperaturas



Con el fin de asegurar la inactivación del virus, fueron sembradas en tubos e incubadas durante 7 días las muestras correspondientes a:

pH ácido y 28 °C, a partir de las 8 h (a las 24, 48 y 72 h y a las 1ra, 2da, 3ra, 4ta, 5ta y 6ta semanas) en que no se observó presencia del virus.

pH básico y 28 °C, a partir de la 5ta y 6ta semanas, en que no se observó presencia del virus.

pH ácido y básico a 5 °C a partir de la 5ta y 6ta semanas, en que no se observó presencia del virus.

Los resultados fueron negativos, o sea, no se observó efecto citopático, por lo que podemos afirmar que el virus realmente fue inactivado.

Discusión

Según varios autores puede considerarse virus modelo aquel que en su conjunto presente resistencia a un amplio rango de agentes fisicoquímicos (13, 15). El virus de la EMC porcina, que pertenece al grupo Picorna, al subgrupo Enterovirus y a la familia Picornaviridae muestra propiedades que lo ayudaron a que constituyese un buen modelo empleado en nuestros estudios, siendo este resistente al éter y al cloroformo pues carece de envoltura lipídica, es poco sensible a las alteraciones de pH, permanece estable a 70°C durante 30 min y a un pH de 9 a 13 el virus permanece viable durante varios días de 25 a 28 °C, además es estable a -70°C en glicerol.

Existe una tendencia a la reducción de la infectividad durante el fraccionamiento alcohólico en general, dado el efecto de partición del proceso y la capacidad de desinfección del etanol (16). Por otra parte, la obtención del Intacglobín como proceso tecnológico, presenta etapas de eliminación viral, independientemente del fraccionamiento alcohólico, tales como: Cromatografía de adsorción de impurezas (17), ultrafiltración y almacenamiento a pH ácido. Calculándose desde el punto de vista teórico que este proceso puede eliminar un factor de 10¹² a 10¹⁵ unidades infectivas.

Nuestro estudio demuestra de manera práctica, que el pH ácido al que es sometido el Intacglobín para su mayor estabilidad durante el almacenamiento es también un método de inactivación viral, mostrando nuestros resultados en correspondencia con lo encontrado en la literatura, donde se plantea que el virus de la hepatitis C que es el de mayor incidencia de transmisión a partir de inmunoglobulinas intravenosas, ha sido inactivado en preparados de este tipo, estabilizados a pH ácido, cuando el proceso tecnológico ha sido asumido correctamente (18).

Por otra parte, entre los diversos métodos de inactivación viral desarrollados y puestos en práctica por los diferentes productores, el tratamiento con calor, ya sea en solución o el llamado calor seco, parece ser de manera general el más efectivo y de hecho uno de los más usados (2, 3, 4, 5, 6). En nuestro trabajo, cuando combinamos el efecto del pH ácido (4.3), con la incubación a altas temperaturas (28 °C) logramos una disminución de 6 log de actividad viral en 8 h.

En otros experimentos desarrollados en nuestro laboratorio (7) y por otros investigadores (8, 9), se muestran también buenos resultados al combinarse la incubación a altas temperaturas por tiempo prolongado (10 horas a 60° C) y el ajuste previo de la solución de inmunoglobulinas a pH ácido, en la mantención de la estabilidad de la molécula de IgG en cuanto a conformación y actividad biológica; demostrando que el uso del pH ácido confiere una mayor estabilidad molecular a la IgG y permite la disociación de los agregados, debido a que las inmunoglobulinas son una familia de moléculas estrechamente relacionadas entre sí con un amplio rango de puntos isoelectrónicos (aproximadamente una unidad de pH) y con 40 cargas superficiales como promedio, confiriendo mayor solubilidad de estas a pH ácido que a pH neutro, donde todavía un gran porcentaje de las mismas tienen neutralizadas sus cargas (10, 11).

Según la Organización Mundial para la Salud (OMS) y las normas de la CEE, se considera una etapa segura, aquella que aporta más de tres logaritmos de reducción de la carga viral y nuestros resultados que se corresponden con una reducción de 6 logaritmos en 8 h, demuestran que la combinación de pH ácido y altas temperaturas es una buena elección de inactivación viral en el Intacglobin.

Referencias

- Gao F, Prince A, Pascual D, Horowitz B. Enhancement in the Safety of Immune Globulins Prepared from High – Risk Plasma. *Vox Sang.* 1993; 64:204–209.
- Dodd R. Infectious risk of plasma donations: relationship to safety of intravenous immune globulins. *Clin Exp Immunol* 1996; 104 (Suppl. 1):3–4.
- Siegel J. Viral Safety Issues in IVIG Products. Safety Issues. *P & T.* 1996; 21-241
- Brenner B. Clinical experience with Octagam, a solvent detergent (SD) virus inactivated intravenous gammaglobulin. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 1996, 14 (Suppl. 15): S115–S119.
- Yap, PL. Viral safety of IVIG. In: *Intravenous Immunoglobulins in clinical practice*. Martin Lee y Vibeke Stand ed. NY, USA: Marcel Dekker Inc. 1997; 601-616.
- Bos O. Virus Validation of pH 4 – treated Human Immunoglobulin Products Produced by the Cohn Fractionation Process. *Biologicals.* 1998; 26:267–276.
- Trocchi N. Removal of Viruses from Human Intravenous Immune Globulin by 35 nm Nanofiltration. *Biologicals*; 1998; 26:321-329.
(Faltan datos)
- EEC. Regulatory Document. Committee for proprietary Medicinal Products: Ad Hoc Working Party on Biotechnology / Pharmacy and Working Party on Safety Medicines. Validation of virus removal and inactivation procedures. *Biologicals.* 1991; 19:24 –25.
- Grun BJ. Viral removal / inactivation by purification of biopharmaceutical. *Biopharm.* 1992; 5 (9):22–30.
- European Plasma Fractionation Association (EPFA) and European Association of the Plasma Products Industries (EAPPI). Points to consider on virus safe plasma products. CPMP ad hoc Working Party on Biotechnology / Pharmacy (1994). *Biologicals.* 1995; 23:193–195.
- White E. Process validation for virus removal and inactivation. *Biopharm.* 1991; 4 (5): 34–39.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoint. *Amer J Hyg.* 1938; 27:493–497.
- Committee Proprietary Medical Products (CPMP). Biotechnology Working Party. Note for guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. CPMP / BWP / 268 / 95. Final version – 2, 1996.
- Hageman TC. Philosophy and goals of validation for biotech and relevance of scale. *Dev. Biol. Stand.* 1992, 76:231–237.
- PDA. Industry perspective on the validation of column - based separation process for purification of protein. *Journal of Parenteral Science and Technology.* 1992; 46(3):87–97.
- Morales A. Estudio preliminar de diferentes parámetros para la inactivación de virus en el Intacglobin. Trabajo de Diploma. Facultad de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Ciudad de La Habana, 1996.
- O'Neil PF, Balkovic ES. Virus harvesting and affinity – based liquid chromatography. *Biotechnology.* 1993; 11:173–7.
- WHO / LBS. Global Blood safety initiative. Viral inactivation of blood and blood products. Prepared on behalf of the WHO by Dr. H. Soumela, Finnish Red Cross Blood Transfusion Service, Helsinki, Finland. 1992.

19. Nowat T; Gregersen P; Klockmann U; Cummins L. Virus Safety of Human Immunoglobulins: Efficient Inactivation of Hepatitis C and Other Human Pathogenic Viruses by the Manufacturing Procedure. *Journal of Medical Virology*. 1992; 36:209–216.
20. Hernández J. Simplificación del proceso de producción del Intaglobín y seguridad en la transmisión de virus. Trabajo de Diploma, Universidad de La Habana, 1997.
21. Uemura Y. Inactivation and elimination of virus during the fractionation of an Intravenous Immunoglobulin Preparation: Liquid Heat Treatment and Polyethylene Glycol fractionation. *Vox Sang*. 1989; 56:155– 61.
22. Bridoneau P. Liquid Pasteurization of an Immunoglobulin Preparation without atabilizer: Effects on its Biological and Biochemical Properties. *Vox Sang*. 1996; 70:203–209.
23. Cádiz A; Castellano ME; Hernández J; Castillo JR; Mustelier P; Ramirez A. Influencia del pH sobre la estabilidad de preparados de inmunoglobulinas intravenosas para uso humano durante el almacenamiento. *Vaccimonitor*. 2000; 9:21-25.
24. Uemura Y. Dissociation of Agregated IgG and Denaturation of Monomeric IgG by Acid Treatment. *Journal Medicine*. 1983; 141:337–349.

Viral Inactivation by pH and Temperature in Intaglobin preparations

Abstract

Swine encephalomyocarditis (SE) was used as a model virus to study viral inactivation in the production process of a human immunoglobulin preparation for intravenous use. Two variables were selected for this: pH and temperature. Four experimental groups were prepared: acid pH (4,3) and 5 °C temperature, acid pH (4,3) and 28 °C temperature, basic pH (7,0) and 5 °C temperature and basic pH (7,0) and 28 °C temperature. In each case, to determine the rate of viral inactivation, samples were taken at different times. The best results with respect to decreasing infectivity were obtained for the samples treated with 4,3 pH and 28 °C temperature, with a total inactivation of the virus after 8 hours. In the samples treated under the other conditions, complete viral inactivation was only observed after 5 weeks. We checked that the chemical and organoleptic characteristics of the product remained unchanged during the 8 weeks the experiment lasted. We concluded that acid pH and high temperatures, as well as the incubation time are important variables in the viral inactivation kinetics.

Keywords: Intravenous immunoglobulin, viral inactivations, pH and temperature.